

# 力学刺激を負荷した培養平滑筋細胞のアクチンダイナミクス

著者	伊藤 一志
号	54
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	工博第4230号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/62041">http://hdl.handle.net/10097/62041</a>

氏名	いとう かずし		
授与学位	伊藤 一志		
学位授与年月日	博士(工学)		
学位授与の根拠法規	平成21年9月9日		
研究科、専攻の名称	学位規則第4条第1項		
学位論文題目	東北大学大学院工学研究科(博士課程) バイオロボティクス専攻		
指導教員	力学刺激を負荷した培養平滑筋細胞のアクチンダイナミクス		
論文審査委員	指 導 教 員 東北大学教授 佐藤 正明		
	主査 東北大学教授 佐藤 正明 東北大学教授 西澤 松彦		
	東北大学教授 和田 仁 東北大学教授 水野 健作		
	教授 大橋 俊朗		
	(北海道大学)		

## 論文内容要旨

繰り返し伸展刺激を負荷した平滑筋細胞は、その形態を変化させる。そのような応答には、細胞内小器官であるアクチンストレスファイバのリモデリングが重要であると近年報告されている。ストレスファイバは細胞骨格であるアクチンフィラメントを架橋タンパク質である $\alpha$ -アクチニンなどによって架橋された束状の構造体である。これまでに繰り返し伸展刺激を負荷した平滑筋細胞におけるストレスファイバの形成過程は明らかになっていない。その課題を明らかにするためには、アクチンの組み込み形態を検討することが重要である。本論文では、以下の研究成果をまとめたものであり、全編5章からなる。

第1章は緒論であり、本研究の背景、目的および構成を述べた。

第2章では、繰り返し伸展刺激を負荷した平滑筋細胞のアクチンリモデリングを評価した。本章での平滑筋細胞への伸展条件は、伸展量20%、伸展周波数0.5 Hzとした。伸展刺激を負荷した平滑筋細胞の経時観察の結果をFig. 1に示す。伸展刺激を負荷した平滑筋細胞は一時的にストレスファイバを消失後(Fig. 1(c))、再形成することが確認された(Fig. 1(e))。また、FRAP法によって、EGFP-actinを発現した平滑筋細胞のアクチンダイナミクスを評価した。その際、Tardyモデルを用いてアクチンターンオーバーおよびアクチンフィラメントとモノマーの相対量を解析した。その結果、伸展刺激を20分間負荷した平滑筋細胞は一時的にアクチンターンオーバーを上昇させることが示された(Fig. 2)。このアクチンターンオーバーの上昇は、ストレスファイバがアクチンフィラメントに分解したことに起因している可能性がある。さらにストレスファイバの消失および再形成の一連の過程において、細胞内のアクチンモノマーとフィラメントの相対量はほとんど変化しないことを確認しており(Fig. 3)、細胞質のアクチンフィラメントの束化がストレスファイバの形成に起因していることを見出した。これはストレスファイバの形成過程を明らかにするために非常に重要な成果である。

第3章では、ミオシンのリン酸化に応じた平滑筋細胞のアクチンリモデリングについて評価した。ミオシンの

リン酸を制御するため、Rho キナーゼインヒターである Y-27632 ( $20\ \mu\text{M}$ ) およびミオシンフォスファターゼインヒターである calyculin A ( $5\text{nM}$ ) を用いた。各試薬添加後の平滑筋細胞におけるリン酸化ミオシンの発現量をウェスタンブロッティングにより評価した。その結果を Fig. 4 に示す。静置培養に比べて、Y-27632 を添加した平滑筋細胞はミオシンのリン酸化が阻害され、calyculin A を添加した場合にはミオシンのリン酸化が上昇した。また、蛍光染色法の結果、ミオシンのリン酸化に伴ってストレスファイバの形成が観察された (Fig. 5 (b))

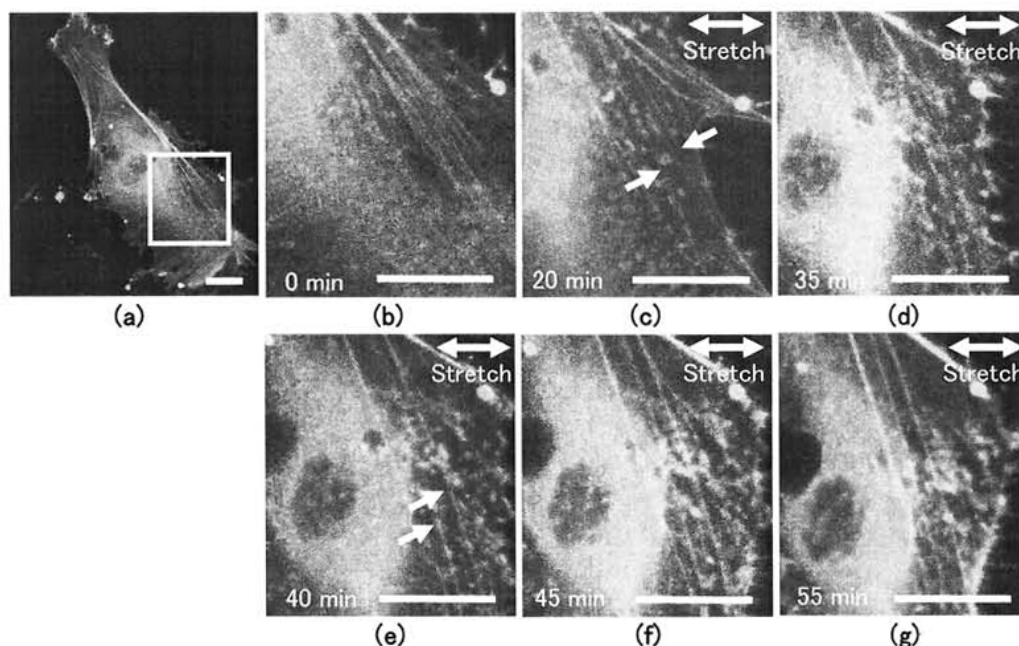


Fig. 1 Time-lapse image of EGFP-actin in SMC in response to cyclic stretch. SMC was under ((a) and (b) ) static condition, and exposed to cyclic stretch for (c) 20, (d) 35, (e) 40, (f) 45 and (g) 55 min. Bar =  $15\ \mu\text{m}$

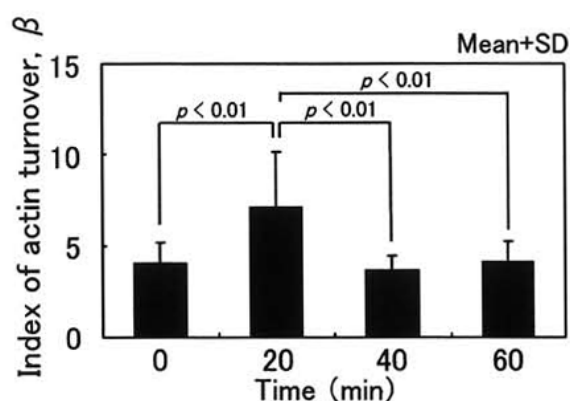


Fig. 2 The index of actin turnover rate,  $\beta$  within photobleached area in SMC exposed to cyclic stretch. Data are mean + SD.

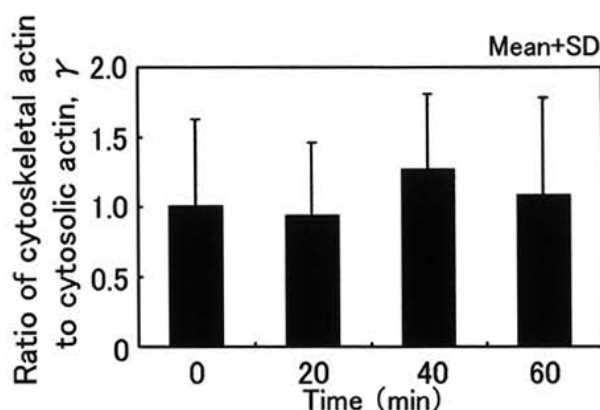


Fig. 3 The ratio of cytoskeletal actin to cytosolic actin,  $\gamma$  within photobleached area in SMC exposed to cyclic stretch. Data are mean + SD.

よび(c))。一方、ミオシンのリン酸化が阻害された場合、ストレスファイバの消失が観察された (Fig. 5 (d)および(e))。このことからミオシンのリン酸化がストレスファイバの形成に重要であることが示された。さらにFRAP法によりミオシンのリン酸化に応じた平滑筋細胞のアクチンダイナミクスも調べた。その結果、アクチンターンオーバーがミオシンのリン酸化に依存していることが確認された。また、ミオシンのリン酸化に伴ったストレスファイバのリモデリングにおいて、細胞内のアクチンモノマーとフィラメントの相対量に統計的な変化は見られなかった (Fig. 6)。これは、ストレスファイバのリモデリングが細胞質のアクチンフィラメントを主体として生じていることを示した重要な結果である。

第4章では、ミオシンのリン酸化に応じた平滑筋細胞の牽引力をマイクロピラーデバイスによって計測した。ミオシンリン酸の調節には、第3章と同様に Y-27632 および calyculin A を用いた。平滑筋細胞の牽引力を計測

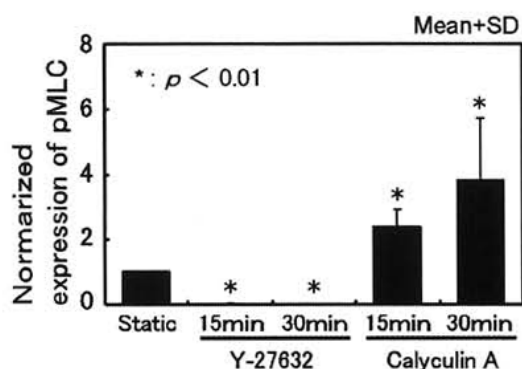


Fig. 4 Expression of pMLC in SMC under static and after treatment of Y-27632 and calyculin A.

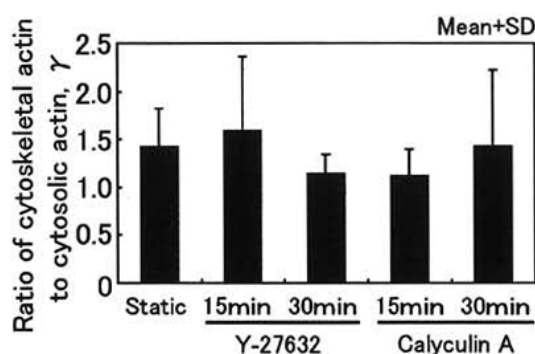


Fig. 6 The cytoskeletal actin to cytosolic actin,  $\gamma$  within photobleached area in SMC. Data are mean $\pm$ SD.

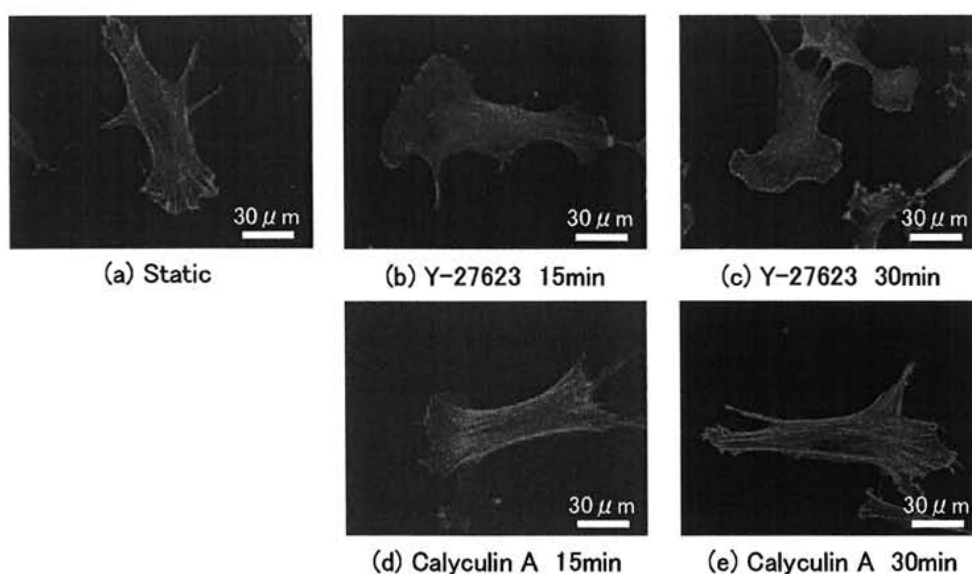


Fig. 5 Fluorescent images of actin filament in SMC. Cells were under (a) static condition and treated with Y-27632 for (b) 15 and (c) 30 min and calyculin A for (d) 15 and (e) 30 min. Bar = 30  $\mu$ m

した結果、各試薬添加前では細胞の辺縁部で牽引力が大きく、細胞中心部において牽引力が小さくなる傾向を観察した (Fig. 7)。また、牽引力は細胞の中心方向に向かって発生している様子が観察された。さらに Y-27632 の添加によってミオシンのリン酸化が阻害された場合、平滑筋細胞の牽引力は時間経過と共に最大牽引力が減少した (Fig. 7(a))。また、Y-27632 添加後 30 分では、ピラーに負荷される牽引力は全て 15nN 以下となった。一方、calyculin A によるミオシンのリン酸化に伴って、牽引力が増加した (Fig. 7(b))。calyculin A 添加前での最大牽引力は約 100nN であったが、添加後の最大牽引力は 15 分で約 126nN、30 分で約 111nN であった。さらに Y-27632 添加後 15 分および 30 分の平滑筋細胞は、ほとんどのストレスファイバを消失させた。calyculin A を投与した細胞では、発達したストレスファイバが辺縁部や突起部において観察された。また、本章では、アクチンターナーオーバーに関連があると報告されているアクチン結合タンパク質コフィリンの分布についても観察を行った。その結果、静置培養における平滑筋細胞では、辺縁部に比べて細胞の中心部に多くコフィリンが分布していた。Y-27632 添加 15 分の平滑筋細胞は、細胞全体にコフィリンが分布している様子が観察された。Y-27632 添加後 30 分では、15 分とほぼ同様に分布していた。calyculin A を投与した平滑筋細胞は、静置培養下と同様に細胞辺縁部においてコフィリンの分布を減少させる様子が見られた。以上の結果より、コフィリンの分布は牽引力に依存しており、牽引力が大きい箇所では、コフィリンの分布が抑制されることが明らかとなった。

第 5 章は結論である。

以上要するに本論文は、繰り返し伸展刺激を負荷した平滑筋細胞はアクチンフィラメントを主体として、ストレスファイバを形成することを示した。

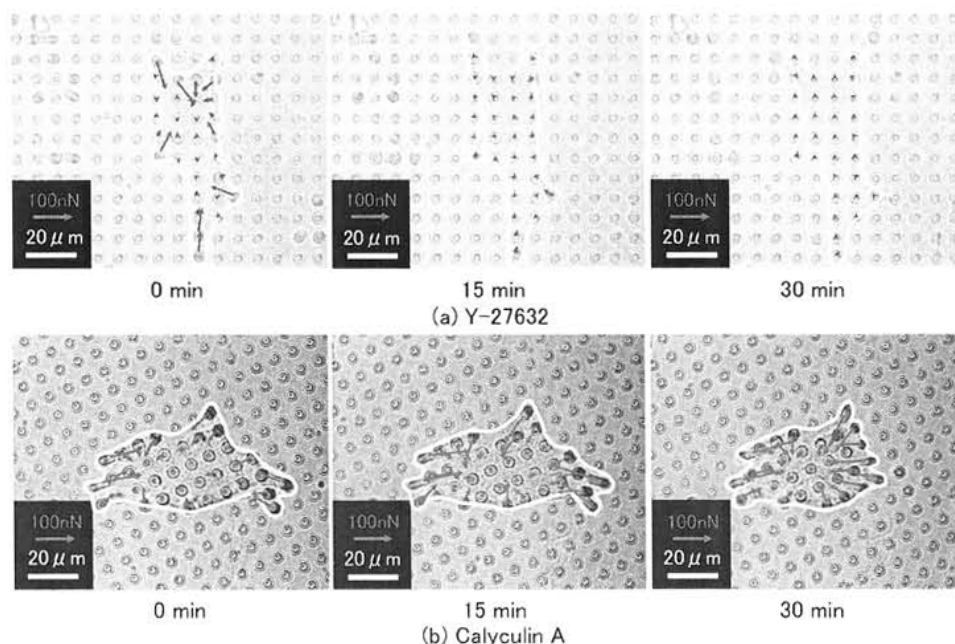


Fig. 7 Differential interference contrast micrograph of SMC and traction force in the cell after treatment of (a) Y-27632 and (b) calyculin A.

# 論文審査結果の要旨

繰り返し伸展刺激を負荷した平滑筋細胞は、その形態を変化させる。そのような応答には、細胞内小器官であるアクチンストレスファイバのリモデリングが重要であると近年報告されている。ストレスファイバは細胞骨格であるアクチンフィラメントを架橋タンパク質である $\alpha$ -アクチニンなどによって架橋された束状の構造体である。これまでに繰り返し伸展刺激を負荷した平滑筋細胞におけるストレスファイバの形成過程は明らかになっていない。その課題を明らかにするためには、アクチンの組み込み形態を検討することが重要である。本論文では、以下の研究成果をまとめたものであり、全編5章からなる。

第1章は緒論であり、本研究の背景、目的および構成を述べている。

第2章では、繰り返し伸展刺激を負荷した平滑筋細胞のアクチンダイナミクスをFRAP法、経時観察および蛍光染色法を用いて詳細に解析している。その結果、伸展刺激を負荷した平滑筋細胞は一時的にストレスファイバを消失後、再形成することを明らかにしている。また、FRAP法によりアクチンターンオーバーが一時的に上昇することを確認している。さらにストレスファイバの消失および再形成の一連の過程において、細胞内のアクチンモノマーとフィラメントの相対量はほとんど変化しないことを確認しており、細胞質のアクチンフィラメントの束化がストレスファイバの形成に起因していることを見出している。これはストレスファイバの形成過程を明らかにするために非常に重要な成果である。

第3章では、ミオシンのリン酸化に応じた平滑筋細胞のアクチンダイナミクスについて解析を行っている。その結果、ストレスファイバの形成がミオシンのリン酸化に依存していることを示している。また、アクチンターンオーバーがミオシンのリン酸化に依存していることも合わせて確認している。さらに本章では、ミオシンのリン酸化に伴ったストレスファイバのリモデリングにおいて、細胞内のアクチンモノマーとフィラメントの相対量はほとんど変化しないことを示している。これは、ストレスファイバのリモデリングが細胞質のアクチンフィラメントを主体として生じていることを示した重要な結果である。

第4章では、ミオシンのリン酸化に応じた平滑筋細胞の牽引力をマイクロピラーデバイスによって計測している。その結果、ミオシンのリン酸化に伴って細胞の牽引力が増加することを確認しており、また、細胞の辺縁部で牽引力が大きく、細胞中心部において牽引力が小さくなる傾向も合わせて観察している。本章では、アクチンターンオーバーに関連があると報告されているアクチン結合タンパク質コフィリンの分布についても観察を行っている。その結果、コフィリンの分布は牽引力に依存しており、牽引力が大きい箇所では、コフィリンの分布が抑制されることを発見している。また、第3章の結果と合わせて本章を考察した場合、平滑筋細胞のアクチンターンオーバーはストレスファイバの張力に依存していることが示されている。これらの結果は、ストレスファイバと細胞生理の関係を理解するために重要な知見である。

第5章は結論である。

以上要するに本論文は、繰り返し伸展刺激を負荷した平滑筋細胞はアクチンフィラメントを主体として、ストレスファイバを形成することを示したものであり、バイオロボティクスおよび機械工学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。